

针灸对环磷酰胺化疗小鼠骨髓细胞 Notch 信号通路差异基因蛋白表达的影响

路玫¹, 付雪鸽², 滕迎春⁴, 曹大明³, 李建伟⁴, 王光安²

(1. 河南中医药大学国际教育学院 河南 郑州 450008; 2. 河南中医药大学针灸推拿学院 河南 郑州 450008; 3. 河南中医药大学职业技术培训鉴定中心 河南 郑州 450008; 4. 河南中医药大学第一附属医院 河南 郑州 450008)

摘 要:目的: 通过观察针灸对环磷酰胺(CTX)化疗小鼠骨髓细胞 notch 信号通路中差异基因蛋白表达的影响, 探讨针灸改善化疗后小鼠骨髓抑制的分子生物学机制。方法: 选用雄性昆明种清洁小鼠 40 只, 体质量(18 ± 2) g, 自由喂养 3 d 后, 随机分为空白组、模型组、针刺组、艾灸组, 每组 10 只。检查基础白细胞计数后, 将两小鼠剔除, 每组仅保留 8 只用于实验的小鼠。针刺组、艾灸组、模型组按照 100 mg/(kg · d) 用量腹腔注射环磷酰胺注射液, 空白组小鼠按体质量 0.02 mL/g 的用量注射生理盐水, 连续 3 d, 第 3 天造模 4 h 后模型成功, 按照小鼠造模的顺序进行治疗。针刺组和艾灸组选取“大椎”“膈俞”“肾俞”“足三里”分别进行针刺和艾灸, 1 次/d, 连续 5 d; 空白组、模型组只抓取、固定, 不治疗。第 6 天小鼠脱颈处死, 在干冰上取一侧的肱骨和股骨, 剔净骨头后, 用生理盐水冲洗, 在 75% 乙醇中浸泡 2 min 后, 再用生理盐水冲洗, 并立即放入 -80 ℃ 低温冰箱保存, 运用 Western-blot 法检测。结果: 针刺和艾灸可使 CTX 小鼠外周血白细胞提前一天回升并提前一天达到正常水平; 治疗 5 d 后, 针刺组、艾灸组与模型组比, jag1、notch2 蛋白含量下降 ($P < 0.05$), numb2 蛋白含量升高 ($P < 0.05$), numb1 蛋白量变化虽无显著性差异 ($P > 0.05$), 但有升高趋势, 针刺组与艾灸组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论: 针刺和艾灸增加 numb 蛋白的含量、降低 notch 蛋白的含量, 抑制过度激活的 notch 信号通路, 应该是针灸减轻骨髓抑制、保护造血功能、增加外周血白细胞的重要机制之一。

关键词: 针灸; 骨髓抑制; 环磷酰胺; notch 信号通路

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2019)05-1031-04

Effect of Acupuncture - Moxibustion on Differential Gene Protein Expression in Notch Signaling Pathway in Bone Marrow Cells of CTX Chemotherapy Mice

LU Mei¹, FU Xuege², TENG Yingchun⁴, CAO Daming³, LI Jianwei⁴, WANG Guang'an²

(1. International Education College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China;
2. School of Acupuncture and Massage, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China;
3. Henan University of Traditional Chinese Medicine Vocational and Technical Training and Appraisal Center, Zhengzhou 450008, Henan, China;
4. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of acupuncture on the expressions of differentially expressed gene proteins in notch signaling pathway in mice bone marrow cells treated with cyclophosphamide(CTX) chemotherapy and explore the molecular mechanism of acupuncture on the improvement of bone marrow inhibition in mice treated with chemotherapy. Methods: A total of 40 male Kunming mice were selected for cleaning, and their weight was (18 ± 2) g. After 3 days free feeding, they were randomly divided into blank group, model group, acupuncture group and moxibustion group. In the acupuncture group, moxibustion group and model group, cyclophosphamide injection was intraperitoneally injected according to the dosage of 100 mg/(kg · d). In the blank group, physiological saline was injected according to the dosage of 0.02 mL/g. Acupuncture group and moxibustion group selected "Dazhui" (GV14), "Geshu" (BL17), "Shenshu" (BL23) and "Zusanli" (ST36) respectively for acupuncture and moxibustion, once a day for 5 consecutive days. The mice in the blank group and model group were treated with immobilization and fixation during the same time. After 6 days,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81072884)

作者简介: 路玫(1958-), 女, 河南新乡人, 教授, 博士研究生导师, 博士, 研究方向: 针灸抗放化疗不良反应、中医针灸基础理论研究。

通讯作者: 曹大明(1957-), 男, 河南郑州人, 教授, 学士, 研究方向: 中医针灸基础理论、针灸抗放化疗不良反应的研究。

we killed mice by taking off the neck and took one side humeru and femur on dry ice and picked the bone after washing with physiological saline. The bone was soaked in 75% ethanol after 2 min, and then washing with physiological saline, and immediately put into -80°C refrigerator, using Western-blot method. **Results:** Acupuncture and moxibustion could make the peripheral blood white blood cells of CTX mice recover one day in advance and reach the normal level the previous day. After 5 days treatment, the protein content of jag1 and notch2 in acupuncture group and moxibustion group decreased ($P < 0.05$). The protein content of numb2 increased ($P < 0.05$) and the protein content of numb1 did not show significant difference ($P > 0.05$), but there was an increasing trend, and there was no significant difference between acupuncture group and moxibustion group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Acupuncture and moxibustion can increase numb protein content, reduce notch protein content and inhibit excessive activation of notch signaling pathway, which should be one of the important mechanisms for moxibustion to reduce bone marrow inhibition, protect hematopoietic function and increase peripheral blood leukocytes.

Key words: acupuncture; bone marrow suppression; cyclophosphamide; Notch signaling pathway

恶性肿瘤严重威胁着人类健康和社会的发展,近年来恶性肿瘤发病率在全球范围内总体呈增长趋势^[1],而手术和放疗则是治疗肿瘤的主要方法。其中常用的化疗药物之一环磷酰胺(CTX)属于烷化剂类免疫抑制剂,同时是一种细胞毒性化疗药物,可破坏DNA结构,阻断复制,从而导致细胞死亡^[2]。但因其缺乏特异性,在杀死肿瘤细胞的同时,也对增殖旺盛的骨髓造血干细胞损伤严重,从而引起骨髓抑制,外周血白细胞下降^[3]。

相关研究^[4-5]证明,notch信号通路的异常表达可导致肿瘤的发生,其过度表达促进肿瘤增长,而阻断notch信号通路则可抑制肿瘤的增殖,且该信号通路可对正常干细胞的增殖、分化和凋亡等功能起到调控作用。既往研究已经从多层次、多角度证实,针灸具有保护化疗机体造血干细胞,改善造血微环境的良好效应^[6],但对针灸如何调控notch信号通路拮抗化疗不良反应的机制研究,尚无涉足。

基于此,前期课题组通过运用基因表达谱芯片技术对小鼠细胞的全基因表达谱进行分析,筛选出了与notch信号通路相关的7个差异基因即: notch1、notch2、jag1、jag2、delta1、numb1、numb2。进一步运用免疫组化法从初步筛选出的7个差异基因中筛选出了numb1、numb2、notch2、jag1 4个显著性差异基因^[3],本实验旨在通过检测针灸后CTX化疗小鼠notch信号通路差异基因蛋白表达量的变化,观察针灸对其所产生的影响,从而进一步探讨针灸减轻骨髓抑制、增加外周血白细胞的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

本实验的实验动物采用SPF级清洁、雄性昆明种(KM)小鼠40只,体质量(18 ± 2)g, [批号: scxk(豫)2010-0002]。由河南省实验动物中心提供,饲养于河南中医药大学实验动物中心,环境温度 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度60%左右,光照时间12 h/d,自由饮食饮水喂养3 d,按小鼠的体质量随机分为空白组、模型组、针刺组、艾灸组,每组10只,每组小鼠用苦味酸溶液进行染色编号。检查基础白细胞计数后,将两极小鼠删除,每组仅保留8只小鼠用于实验。

1.2 试剂

环磷酰胺 0.2 g/瓶(山西普德药业有限公司,批号: 04120501)、0.9% NaCl 250 mL/瓶(山东鲁抗辰欣药业有限

公司,批号: 120412107)、冰乙酸(郑州中日派尼化学试剂厂,批号: 20100513)、75%医用乙醇(郑州市盛硕商贸有限公司,批号: 20100706)、混合颗粒鼠饲料(河南医科大学实验动物中心,批号: scxk(豫)2010-0002)、苦味酸、PVDF膜,孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ (millipore公司)、蛋白预染Marker(碧云天公司)、显影粉(上海冠龙公司)、定影粉(上海冠龙公司)、X光胶片(上海冠龙公司)、蛋白浓度的定量试剂盒(碧云天公司)、BCA法蛋白定量试剂盒(碧云天公司)、电泳缓冲液及丙烯酰胺(上海迪生生物技术有限公司)。

1.3 仪器

双目光学显微镜(日本产)、美容毫针(佳健医疗器械用品有限公司,规格: $0.19 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$)、卧龙牌美容艾条(河南南阳卧龙艾绒厂,规格: $0.4 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$)、JT6001电子天平(郑州市电子仪器厂)、自制小鼠固定板、白细胞吸管、移液器、肾形盘、手术刀柄、手术刀片、白细胞计数板、一次性试管、注射器、大小烧杯各3个、玻璃棒、盖玻片、医用消毒纱布若干块、棉线手套、一次性无菌手套、一次性口罩及帽子、一次性鞋套、电泳仪(型号: mini protean 3 cell)、电转仪(型号: PS-9)、发光剂(货号: RPN2106)。

2 方法

2.1 模型制作方法

依据《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》(中华人民共和国卫生部药政局编)^[7]的造模方法,用环磷酰胺建立骨髓抑制小鼠模型。按照 $100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 用量腹腔注射,连续3 d。依据环磷酰胺药代动力学过程,4 h后药物活性消失,模型即成^[8]。

2.2 取穴及治疗方法取穴

“大椎”“膈俞”(双)“肾俞”(双)“足三里”(双)。穴位定位: 依据《中国兽医针灸学》定位小鼠穴位^[9]。“大椎”位于背部正中,平第7颈椎与第1胸椎间。“膈俞”位于第7胸椎下左右两旁。“肾俞”位于第2腰椎下左右两旁肋间;“足三里”位于后肢膝关节下外侧,腓骨小头下方约5 mm处^[10]。

各组小鼠依次在造模结束4 h模型成功后进行治疗。

针刺组: 按照各组小鼠造模时间的先后顺序进行针刺治疗,各组小鼠配对同时进行,针具选用佳健牌美容毫针,采用直刺法,进针深度为3 mm,留针时间为6 min,每日治

疗1次,连续治疗5 d。

艾灸组:按照各组小鼠造模时间的先后顺序进行艾灸治疗,各组小鼠配对同时进行。艾条选用卧龙牌特制美容细艾条,点燃后在距离穴位皮肤2 cm处固定悬灸3 min,每日治疗1次,连续治疗5 d。

空白组、模型组:每天陪同抓取、固定,不治疗。

2.3 观测指标及方法

2.3.1 针灸对CTX化疗小鼠外周血白细胞计数的影响
从小鼠注射CTX前一天开始到3 d造模以及5 d针灸治疗期间,每天早上7:30进行采血。方法是割破小鼠尾静脉,取静脉血10 μ L,滴入事先加好390 μ L 3%冰乙酸稀释液的试管中,将试管中的血样本摇匀后,用玻璃棒蘸取少量血样本从盖玻片边缘滴入细胞计数板上后,用双目光学显微镜进行外周血白细胞计数检测。

2.3.2 针灸对CTX化疗小鼠notch通路中差异基因蛋白量的影响
治疗5 d后,小鼠脱颈处死,将干冰置于超净工作台上,在干冰上取一侧的肱骨和股骨,剔净骨头后,用生理盐水冲洗,在75%乙醇中浸泡2 min后,再用生理盐水冲洗,并立即放入-80 $^{\circ}$ C低温冰箱保存,以备Western-blot法检测。实验流程如下。

(1)制备样品:①蛋白质抽提:取样品 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 细胞,用PBS清洗,去除PBS后,加入1 mL含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂,匀浆后抽提总蛋白。②蛋白质定量:按试剂盒操作说明操作,测定样品浓度。

(2)操作流程:①电泳:凝胶为12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,浆蛋白的每孔的上样量为50 μ g总蛋白。电压100 V,15 min;120 V恒压,1.5 h。②转膜:半干转,1.5 h。电转液为1 L溶液含3.0 g Tris,14.4 g 甘氨酸,200 mL 甲醇。③封闭:含5%脱脂牛奶的PBST,室温1 h。④加一抗:分别是ACTB(abcam)稀释液为含5%脱脂奶粉的PBST,稀释1:5000。4 $^{\circ}$ C,一抗室温孵育2 h。⑤洗膜,PBST洗涤3次,每次5 min。⑥加二抗,室温摇晃2 h。⑦洗膜,PBST洗涤3次,每次5 min。⑧发光:加入发光剂,X光胶片曝光,压片约3 min后,显影。

2.4 统计结果

采用SPSS 18.0进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较首先判断样本的正态分布情况,然后运用方差齐性检验,若方差齐,则采用单因素方差分析;若方差不齐,先进行方差校正,再运用单因素方差分析;检验标准取 $\alpha = 0.05$ 。若不服从正态分布,均采用非参数检验。

3 结果

3.1 针灸对CTX化疗小鼠外周血白细胞计数的影响

造模期间,空白组小鼠白细胞均在正常范围内,而模型组、针刺组、艾灸组小鼠白细胞明显下降,各组与空白组比较具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。说明化疗药物环磷酰胺对小鼠具有明显的细胞不良反应,可以降低外周血中的白细胞,提示造模成功。见表1。

治疗3 d后,针刺组与艾灸组的白细胞计数均开始回升,而模型组白细胞计数持续下降,其中针刺组与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);治疗4 d后,针刺组和

艾灸组白细胞计数均明显升高,与模型组比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);治疗5 d后,针刺组、艾灸组与正常组比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),而模型组白细胞仍较低,与正常组比较有统计学意义($P < 0.05$),针刺和艾灸比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果显示,与模型组比较,针刺组和艾灸组可使CTX小鼠白细胞提前一天回升,并提前一天接近正常白细胞水平,表明针灸改善化疗后骨髓抑制、升高白细胞具有确切的疗效。见表2。

表1 CTX造模前后各组小鼠外周血白细胞计数的变化($\times 10^9/L$, $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	1/0	2/1	3/2	4/3
空白组	8.56 $\pm$ 2.362	10.05 $\pm$ 1.794	8.43 $\pm$ 0.570	7.33 $\pm$ 2.020
模型组	6.48 $\pm$ 1.969	5.14 $\pm$ 2.365 ¹⁾	2.85 $\pm$ 1.111 ¹⁾	1.41 $\pm$ 0.562 ¹⁾
针刺组	6.86 $\pm$ 3.567	4.35 $\pm$ 1.604 ¹⁾	2.16 $\pm$ 0.717 ¹⁾	1.28 $\pm$ 0.311 ¹⁾
艾灸组	7.01 $\pm$ 1.599	4.51 $\pm$ 0.730 ¹⁾	2.30 $\pm$ 0.334 ¹⁾	1.14 $\pm$ 0.256 ¹⁾

注:与空白组比较,1) $P < 0.05$

表2 治疗前后健康小鼠外周血白细胞计数变化($\times 10^9/L$, $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
空白组	7.33 $\pm$ 2.020	7.84 $\pm$ 2.107	8.29 $\pm$ 0.948	7.60 $\pm$ 0.854	9.80 $\pm$ 0.578
模型组	1.41 $\pm$ 0.562 ¹⁾	1.49 $\pm$ 0.552 ¹⁾	0.76 $\pm$ 0.288 ¹⁾	3.60 $\pm$ 0.896 ¹⁾	5.85 $\pm$ 1.242 ¹⁾
针刺组	1.28 $\pm$ 0.311 ¹⁾	1.01 $\pm$ 0.253 ¹⁾	2.48 $\pm$ 2.266 ¹⁾²⁾	5.95 $\pm$ 1.954 ²⁾	8.06 $\pm$ 0.713
艾灸组	1.14 $\pm$ 0.256 ¹⁾	1.26 $\pm$ 0.267 ¹⁾	2.01 $\pm$ 0.356 ¹⁾	5.48 $\pm$ 0.623 ¹⁾²⁾	7.50 $\pm$ 0.961

注:与空白组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$

3.2 Western-blot法检测针灸对CTX化疗小鼠notch信号通路中差异基因蛋白表达量的影响

模型组与正常组比较,numb1、numb2蛋白含量较正常组下降,其中numb2下降明显具有显著性差异($P < 0.05$),jag1、notch2蛋白含量较正常组明显升高,具有显著性差异(均 $P < 0.05$),提示CTX可降低numb蛋白(numb1、numb2)含量,升高notch蛋白(jag1、notch2)含量,抑制骨髓造血干/祖细胞的增殖。针灸治疗5 d后,针刺组与模型组比,notch蛋白含量下降,且具有显著性差异($P < 0.05$),numb蛋白量变化虽无显著性差异($P > 0.05$),但有升高趋势;艾灸组与模型组比较,notch蛋白含量下降,且具有显著性差异($P < 0.05$),numb2蛋白含量升高,且具有显著性差异($P < 0.05$),numb1蛋白量变化无显著性差异,但亦呈升高趋势;针刺组与艾灸组相比无统计学差异。表明针灸可以通过增加numb蛋白含量、降低notch蛋白含量。见表3。

表3 针灸对CTX健康小鼠notch通路中差异基因蛋白量的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	jag1	notch2	numb1	numb2
空白组	2 059.5 $\pm$ 634.417	4 256.9 $\pm$ 850.04	2 911.8 $\pm$ 632.6	3 576.1 $\pm$ 383.26
模型组	2 981.0 $\pm$ 796.30 ¹⁾	5 306.9 $\pm$ 996.59 ¹⁾	2 323.6 $\pm$ 902.55	2 758.4 $\pm$ 644.68 ¹⁾
针刺组	2 076.7 $\pm$ 546.32 ²⁾	4 294.9 $\pm$ 572.11 ²⁾	3 065.4 $\pm$ 849.17	3 318.7 $\pm$ 364.72
艾灸组	2 113.2 $\pm$ 312.18 ²⁾	4 247.0 $\pm$ 808.03 ²⁾	2 953.0 $\pm$ 921.95	3 412.0 $\pm$ 580.86 ²⁾

注:与空白组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$

4 讨论

针对化疗后患者骨髓抑制、白细胞减少,祖国医学虽无此病名的记载,但其出现的身体羸瘦、食少厌食、少气乏力、脉虚无力等一系列虚弱症状,可将其归属于“虚劳”的范

畴,主要由于脾胃虚弱,气血双亏,肾精不足所致,与脾肾关系密切^[11]。治疗时应重视培补脾肾,促进各虚损脏腑的恢复。课题组前期大量研究已经证实^[12-13] 针灸大椎、膈俞、肾俞、足三里四穴可以拮抗化疗药物的不良反应,改善骨髓抑制,保护机体造血功能,提升白细胞。其中大椎位于督脉,乃诸阳之会,有振奋阳气、扶正祛邪之功;膈俞为八会穴之血会,可养血活血;现代研究表明^[14] 针刺大椎、膈俞可增加白细胞和中性粒细胞的数量,产生显著的免疫调节作用,肾俞有温补肾阳、填精益髓之效;足三里既是胃腑之下合穴,又是足阳明胃经的合穴,有健脾胃、补气血之用。四穴合用可共奏益气健脾、补肾温阳、益精填髓之功^[6]。

随着化疗药物的不断研发,肿瘤的治疗效果有了很大提高,但其免疫抑制的不良反应却难以克服^[15],近年来有相关研究报道 notch 信号通路是少数能够反复调节细胞增殖和凋亡的信号转导系统,其由 notch 受体(notch1、notch2等)、notch 配体(jagged1等)、notch 调节分子及 DNA 结合蛋白等组成^[16]。该信号通路在多个物种中表达且在细胞的生长发育中起到了重要作用,其生理功效是抑制细胞分化,维持其幼稚状态^[17-19]。若 notch 受体与配体大量表达,将对造血系统等产生影响,造成分化细胞增加,而增殖细胞减少^[20]。而 numb 蛋白属于 notch 信号转导抑制蛋白,是一个非常重要的细胞命运决定因子,通过不对称有丝分裂拮抗 notch 家族的胞质膜受体而实现对子细胞命运的决定作用^[21-22]。该蛋白亦是 notch 信号通路上的负性调节因子,类似于一种接头蛋白,可以抑制干细胞和祖细胞中的 notch 信号转导^[23-24]。notch 蛋白与 numb 蛋白互为拮抗关系,numb 蛋白可以抑制 notch 蛋白的活性^[25],因此若 numb 蛋白调控 notch 蛋白的作用丧失,导致了 notch 信号通路的激活,将会使骨髓造血干/祖细胞增殖作用减弱,而分化细胞持续增加,造成骨髓造血干/祖细胞的数量减少,引起骨髓抑制,外周血白细胞减少。故本研究以外周血白细胞计数的动态变化、numb 蛋白和 notch 蛋白的含量为检测指标,探讨针灸改善骨髓抑制的分子生物学机制。

本研究结果显示:治疗组与模型组白细胞数分别在造模停药后第2天和第3天降至最低,说明环磷酰胺对小鼠造成的细胞毒反应可呈持续状态,针灸对其可发挥拮抗作用,使白细胞分别在第3天和第4天开始逐渐回升,表明针灸改善化疗后骨髓抑制,升高白细胞具有确切疗效。应用 Western-blot 法检测针灸对 CTX 化疗小鼠 notch 信号通路中差异基因蛋白表达量,结果表明针灸可以降低 jag1、notch2 蛋白含量,增加 numb1、numb2 蛋白的含量,提示针灸可以抑制异常激活的 notch 信号通路,使骨髓造血干/祖细胞增殖作用增强,分化细胞减少,从而增强骨髓造血功能。因此我们认为,调控 notch 信号通路蛋白表达量,抑制过度激活的 notch 信号通路,应该是针灸改善骨髓抑制,保护造血功能,提升白细胞的关键环节之一。

参考文献

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 3-5.
- [2] 宋雁,贾旭东,崔文明,等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013,

25(3): 219.

- [3] 滕迎春. 针灸对健康小鼠环磷酰胺所致骨髓抑制 Notch 信号通路影响的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015: 45-46.
- [4] CHIU HW, HO YS, WANG YJ. Arsenic trioxide induces autophagy and apoptosis in human glioma cells in vitro and in vivo through downregulation of surviving [J]. Jmol med, 2011, 89(9): 927-941.
- [5] INGRID, LUCIOM. Notch inhibitors for cancer treatment [J]. Pharmacol Ther, 2013, 139(2): 95-110.
- [6] 路玫,李昆珊,曹大明,等. 针灸对环磷酰胺化疗小鼠骨髓细胞 DNA 含量动态变化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3687-3690.
- [7] 中华人民共和国卫生部药政司. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编[S]. 1993: 103.
- [8] 中山医学院. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 221.
- [9] 于船. 中国兽医针灸学[M]. 北京: 农业出版社, 1984: 209.
- [10] 华兴邦,李群蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, 3(1): 2-3.
- [11] 于冬冬. 针灸对 CTX 化疗荷瘤小鼠骨髓细胞中 Notch 信号通路相关差异基因调控的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015: 12-15.
- [12] 路玫,王延超,于冬冬,等. 针灸对 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 含量的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(11): 1146-1147.
- [13] 路玫,肖婷婷,曹大明,等. 针灸对骨髓抑制模型小鼠血清造血生长因子等含量的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(3): 265-266.
- [14] 王玉洁,朱中书,杨文笑,等. 针刺大椎、膈俞治疗白细胞减少症 39 例[J]. 中国针灸, 2016, 36(1): 6.
- [15] 杨宪勇. 应用环磷酰胺构建 C57BL/6J 小鼠免疫抑制模型[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(40): 7486-7490.
- [16] 吴科荣,张立,许乐,等. 肾透明细胞癌 NOTCH1 与 JAG1 的表达及意义[J]. 中国临床医学, 2010, 17(4): 540-542.
- [17] Kojika S, Griffin JD. Notch, rePetorsnadhematopoiesis [J]. Exp-Hematol, 2001, 29: 1041-1052.
- [18] Allmna D, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in hematopoiesis and early lym1Phocyte development [J]. Immunol Rev, 2002, 187: 75-86.
- [19] Ohishi K, Katayama N, Shiku H, et al. Notch signaling in hematopoiesis [J]. Semin Cell Dev Biol, 2003, 14: 143-150.
- [20] 刘兆国,朱智杰,周梁,等. Notch 信号通路对肿瘤研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1045.
- [21] 廖湘晖,姚伟红,官成浓. 肝细胞癌组织中 Numb 蛋白与 P53 蛋白的表达及相关性[J]. 医学信息, 2010, 23(5): 1229-1230.
- [22] 官成浓,廖湘晖,罗海清,等. 肝细胞癌组织中 Numb、P53 蛋白的表达及其意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(11): 974-976.
- [23] Song Y, Lu B. Interaction of Notch signaling modulator Numb with alpha-Adaptin regulates endocytosis of Notch pathway components and cell fate determination of neural stem cells [J]. J Biol Chem, 2012, 287(21): 17716-17728.
- [24] 马永菽. Numb 蛋白在肿瘤中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2016, 10(13): 1976.
- [25] 韩帮锋. Numb 蛋白抑制肿瘤发生的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2011, 38(1): 67-69.